

超声波辅助碱法提取辣椒渣中蛋白质的工艺优化

Comparison and optimization on extraction of protein in pepper residues
by ultrasonic-assisted alkali method

唐鑫媛

夏延斌

文新昱

王亮亮

TANG Xin-yuan XIA Yan-bin WEN Xin-yu WANG Liang-liang

(湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

(College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

摘要:以辣椒渣为原料,对单一碱法和超声辅助碱法提取蛋白质进行研究。单因素结果表明,超声辅助碱法优于单一碱法,提高了提取率,缩短了提取时间。经正交试验获得最佳提取工艺条件:料液比 1:25($m:V$),碱液浓度 0.3 mol/L,超声温度 60 °C,超声时间 120 min,辣椒蛋白质的提取率达到 86.41%,蛋白质粗提物中蛋白质质量分数为 60.09%,并测得辣椒蛋白质的最佳等电点为 pH 3.6。

关键词:辣椒;蛋白质;碱法;超声波;提取

Abstract: With pepper residues as raw materials, extracting the protein through simple alkali method and ultrasonic waves alkali method were researched. The single-factor experiments showed that ultrasonic waves alkali method was much better than simple alkali method by increasing the protein extraction rate and largely reducing the extracting time. On the basis of orthogonal experimental design, it was concluded that the maximum protein extracted from alkali solution was 86.41% and 60.09% from the sediments after acidification and lyophilization. The best conditions were acquired by the material-liquid ratio 1:25($m:V$), NaOH 0.3 mol/L, ultrasonic for 120 min with the temperature of 50 °C and the ideal isoelectric point tested at pH 3.6.

Keywords: capsicum; protein; alkali method; ultrasonic waves; extraction

辣椒是中国一种重要的药食同源的蔬菜,同时也是主要的辛辣调味品^[1]。辣椒富含辣椒碱、辣椒红素、 β -胡萝卜素、蛋白质、 V_C 等。其中辣椒红素已被美国 FAO、WHO 和中国国标等组织审定为无限制性使用的天然食品添加剂^[2]。目前,美国一年所需辣椒红色素越 1 000 t;日本每年约需辣椒红色素 500 t;加拿大、澳大利亚、西欧等市场的需求量也很

大。中国盛产辣椒,是世界上最大的辣椒红色素出口国^[3]。然而,红辣椒在提取辣椒红素后会产生大量的废料,如辣椒渣,其产率可达到所投原料干辣椒的 80%^[4]。辣椒渣,又称辣椒粕,含有蛋白质、脂肪、糖类、 V_{B1} 、尼克酸及多种矿物质等;蛋白质含量较高约 14%~19%,并含有大量人体必需氨基酸^[4]。

常用的蛋白质提取方法有水溶液提取法、有机溶液提取法、酶法、超声波辅助提取法等^[5]。目前已有针对辣椒渣中黄酮、总酚、抗氧化物质等物质提取的研究^[6,7],但对辣椒渣中蛋白质提取的研究迄今尚未见诸于报道。本研究拟以辣椒渣为原料,采用碱法和超声波结合的方法,以提取时间、提取温度、料液比、碱液浓度为主要因素,以辣椒渣蛋白质提取率为指标,通过单因素和正交试验,探讨最佳辣椒蛋白的提取工艺,为辣椒渣的高值化利用打下理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验样品

辣椒渣:山东中椒英潮辣业发展有限公司。凯氏定氮法测定其蛋白质含量为 15.67%;经氨基酸自动分析仪分析辣椒渣中蛋白质氨基酸组成,测得辣椒蛋白质为酸性蛋白质,进一步确定了采用碱液提取的可靠性^[8]。

1.1.2 主要试剂

NaOH:分析纯,天津市船化学试剂科技有限公司;
硫酸、盐酸:分析纯,衡阳市凯信化工试剂有限公司;
 $CuSO_4$ 、 K_2SO_4 、硼酸:分析纯,西陇化工股份有限公司。

1.1.3 主要仪器与设备

中药粉碎机:FW177 型,天津市泰斯特仪器有限公司;
数控超声波清洗仪:KQ-250DE 型,昆山市超声仪器有限公司;

基金项目:湖南省教育厅科学研究重点项目(编号:13A040)

作者简介:唐鑫媛(1990—),女,湖南农业大学在读硕士研究生。

E-mail:txy. ci@163.com

通讯作者:夏延斌

收稿日期:2014-12-27

低速离心机:LD5-2A 型,北京时代北利离心机有限公司;
pH 计:PHS-3C 型,上海精密科学仪器有限公司;
冷冻干燥机:FD-1B 型,北京博医康实验仪器有限公司;
全自动凯氏定氮仪:VAP50S 型,德国 Gerhardt 公司。

1.2 蛋白质含量的测定

采用凯氏定氮法^[9]。按式(1)计算蛋白提取率:
$$\text{蛋白质提取率} = \frac{\text{上清液中蛋白质的含量}}{\text{辣椒渣中蛋白质的含量}} \times 100\% \quad (1)$$

1.3 试验方法

1.3.1 工艺流程

辣椒渣→粉碎→过筛→碱法提取/超声辅助碱法提取→离心→上清液→酸沉→离心→沉淀→透析脱盐→冷冻干燥→辣椒粗蛋白^[10]

1.3.2 最适原料粒度的确定 对原料进行粉碎,分别过 20, 40,60,80,100,120 目筛,称取各粒度辣椒渣 20 g,在碱液浓度 0.1 mol/L,料液比为 1:25(*m*:*V*),提取温度 40 ℃的条件下提取 1 h,测定蛋白质提取率,选取最优原料粒度^[10]。

1.3.3 辣椒渣蛋白质单一碱法提取工艺

(1) 提取时间对辣椒蛋白质提取的影响:称取过筛 100 目的辣椒渣 20 g,在碱液浓度 0.3 mol/L,料液比 1:25(*m*:*V*),提取温度 50 ℃的条件下,分别考察不同处理时间(30,60, 90,120,150,180,210,240 min)对辣椒蛋白质提取的影响。

(2) 提取温度对辣椒蛋白质提取的影响:称取过筛 100 目的辣椒渣 20 g,在碱液浓度 0.3 mol/L,料液比 1:25(*m*:*V*),提取时间 120 min 的条件下,分别考察不同提取温度(30,40,50,60,70 ℃)对辣椒蛋白质提取的影响。

(3) 料液比对辣椒蛋白质提取的影响:称取过筛 100 目的辣椒渣 20 g,在碱液浓度 0.3 mol/L,提取温度 50 ℃,提取时间 120 min 的条件下,分别考察不同料液比(1:10,1:15,1:20,1:25,1:30,1:35,1:40(*m*:*V*))对辣椒蛋白质提取的影响。

(4) 碱液浓度对辣椒蛋白质提取的影响:称取过筛 100 目的辣椒渣 20 g,在料液比 1:25(*m*:*V*),温度 50 ℃,提取时间 120 min 的条件下,分别考察不同碱液浓度(0.06, 0.08,0.10,0.20,0.30,0.40,0.50 mol/L)对辣椒蛋白质提取的影响。

1.3.4 辣椒渣蛋白质超声碱法提取工艺

(1) 超声波功率对辣椒蛋白质提取的影响:称取过筛 100 目的辣椒渣 20 g,在碱液浓度 0.1 mol/L,料液比为 1:25(*m*:*V*),提取温度 40 ℃,提取时间 1 h 的条件下,分别考察不同超声波功率(0,100,150,200,250 W)对辣椒蛋白质提取的影响。

(2) 提取时间对辣椒蛋白质提取的影响:称取过筛 100 目的辣椒渣 20 g,在碱液浓度 0.3 mol/L,料液比 1:25(*m*:*V*),提取温度 50 ℃的条件下,分别考察不同超声提取时间

(30,60,90,120,150 min)对辣椒蛋白质提取的影响。

(3) 提取温度对辣椒蛋白质提取的影响:称取过筛 100 目的辣椒渣 20 g,在碱液浓度 0.3 mol/L,料液比 1:25(*m*:*V*),超声提取时间 120 min 的条件下,分别考察不同提取温度(30,40,50,60,70 ℃)对辣椒蛋白质提取的影响。

(4) 料液比对辣椒蛋白质提取的影响:称取过筛 100 目的辣椒渣 20 g,在碱液浓度 0.3 mol/L,提取温度 50 ℃,超声提取时间 120 min 的条件下,分别考察不同料液比(1:10, 1:15,1:20,1:25,1:30,1:35,1:40(*m*:*V*))对辣椒蛋白质提取的影响。

(5) 碱液浓度对辣椒蛋白质提取的影响:称取过筛 100 目的辣椒渣 20 g,在料液比 1:25(*m*:*V*),温度 50 ℃,超声提取时间 120 min 的条件下,分别考察不同碱液浓度(0.06, 0.08,0.10,0.20,0.30,0.40,0.50 mol/L)对辣椒蛋白质提取的影响。

1.3.5 辣椒蛋白质提取条件的优化 以辣椒蛋白质提取率为指标,选取最适原料粒度和最适超声功率,并通过单一碱法和超声辅助碱法分别研究提取时间、提取温度、料液比和碱液浓度对辣椒蛋白质提取率的影响。选取最优的单因素条件,进行正交试验设计,确定最佳蛋白质提取工艺。

1.3.6 辣椒蛋白质等电点的测定 在正交最优提取条件下,提取辣椒蛋白质,将提取液分装于 50 mL 离心管,每管 30 mL,用 1 mol/L HCl 调节各管提取液 pH 分别为 2.8, 3.0,3.2,3.4,3.6,3.8,4.0,4.2,4.2,4.4,4.6。静止 30 min, 3 000 r/min 离心 5 min,去上清液,沉淀经干燥后称重。沉淀物最重的即为辣椒蛋白质的等电点。

2 结果与分析

2.1 原料粒度对辣椒蛋白质提取的影响

由图 1 可知,随着原料粒度的增大,蛋白质提取率呈现增大的趋势,从 20 目的 39.41%到 120 目的 46.02%,原料粒度每增大 20 目,蛋白质提取率平均提高 1.32%。原料粒度从 100 目到 120 目,蛋白质提取率仅增加 0.46%。同时原料粒度增大,蛋白质提取率提高,其他可溶性杂质也更容易

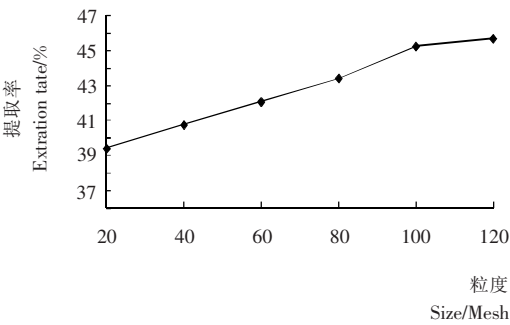


图 1 原料粒度对辣椒蛋白质提取的影响
Figure 1 Effect of material size on extraction rate of pepper protein

被溶出,降低粗提取物中蛋白质的含量,且增加后期纯化难度^[11]。综合考虑,原料适宜粉碎粒度为 100 目。

2.2 超声功率对辣椒蛋白质提取的影响

由图 2 可知,采用超声波辅助碱法提取辣椒渣蛋白质后,辣椒渣蛋白质提取率显著提高,超声功率 250 W 时的提取率比无超声辅助提取的提取率高出 31.71%。超声波功率为 100,150,200,250 W 时,辣椒渣蛋白质提取率由 70% 分别提高至 72%,74%,77%,超声波功率越高,辣椒渣蛋白质提取率越大。研究表明:对于一定频率的超声波,功率增大,声强越大,空化泡崩溃的时间变短,提高了目的物的提取率^[12]。综合考虑,超声波功率应选 250 W。

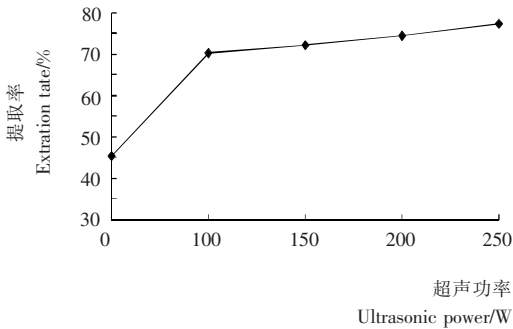


图 2 超声功率对辣椒蛋白质提取的影响

Figure 2 Effect of ultrasonic power on extraction rate of pepper protein

2.3 提取时间对辣椒蛋白质提取的影响

由图 3 可知,两种试验方法的提取率都随着提取时间的延长而提高,单一碱提法的蛋白质提取率持续稳定上升,而超声波辅助碱法在 90~150 min 时,提取率提高得不显著。单一碱法在提取时间 240 min 时,提取率达到 64.12%,小于超声提取时间 30 min 的提取率 66.19%。由此可见,超声波的辅助作用能显著缩短辣椒蛋白质的提取时间;同时超声时间 150 min 时,提取率达到 85.73%,比相同时间的单一碱法提取率高 24.5%,超声波辅助在很大程度上提高了蛋白质的提取率。这是因为超声波振动引起细胞内物质运动,改变

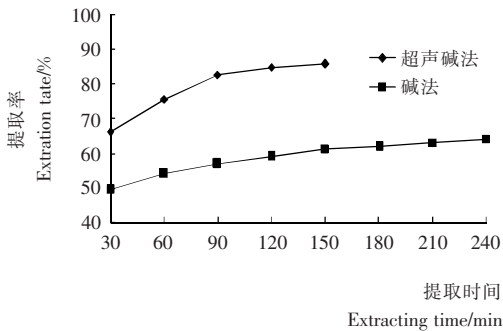


图 3 提取时间对辣椒蛋白质提取的影响

Figure 3 Effect of extracting time on extraction rate of pepper protein

了细胞通透性同时单向振动引发膨胀,增多及加快了碱液向原料细胞渗透的几率和速度,从而显著减少了提取的时间,增大了提取率^[13]。综合考虑,选择最佳提取时间是超声提取 90 min,此时提取率为 82.6%。

2.4 提取温度对辣椒蛋白质提取的影响

由图 4 可知,单一碱法的提取率随着温度的上升一直显著提高,在 70 ℃ 时,蛋白质提取率为 82.25%,而超声辅助提取温度达到 50 ℃ 时,蛋白质提取率为 84.91%,随后趋于稳定。随着温度的提高,水分子的热运动加剧,与此同时蛋白质分子的立体结构伸展,这样有利于蛋白质的溶解,从而提高了提取率;但是温度过高,易导致辣椒蛋白质热变性,不利于蛋白质的加工应用^[13]。综合考虑,超声辅助碱液法的最

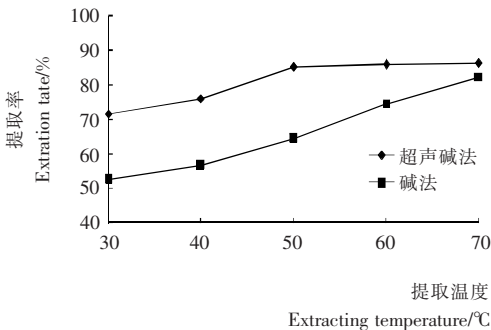


图 4 提取温度对辣椒蛋白质提取的影响

Figure 4 Effect of extracting time on extraction rate of pepper protein

2.5 料液比对辣椒蛋白质提取的影响

由图 5 可知,随着料液比的增大,两种提取方法的提取率都是先增大后降低。随着料液比的增大,体系的黏度降低,传质过程加快,因而提取率提高;但料液比过高,蛋白质提取率增加缓慢,不利于蛋白质的后期沉淀,且增加提取后废水处理的负担^[14]。单一碱法和超声辅助碱法分别在料液比为 1:30 和 1:25($m:V$)时,提取率达到最大。

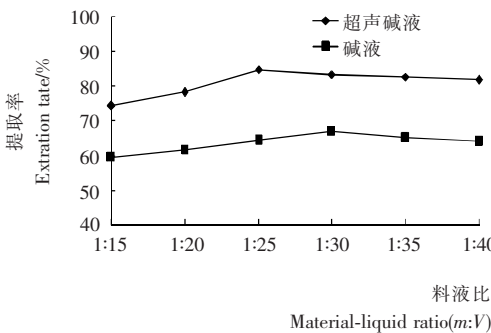


图 5 料液比对辣椒蛋白质提取的影响

Figure 5 Effect of solid-liquid ratio on extraction rate of pepper protein

2.6 碱液浓度对辣椒蛋白质提取的影响

由图 6 可知,随着碱液浓度的提高,辣椒渣中蛋白质的提取率不断提高。碱液浓度 0.5 mol/L 比 0.06 mol/L 时,辣椒渣蛋白质提取率高了 25%;碱液浓度由 0.3 mol/L 升至 0.5 mol/L 时,蛋白质提取率增大的幅度减缓,仅提高了 1.7%;单一碱法提取时,辣椒渣中蛋白质提取率即使在高碱液浓度的条件下仍然很低,为 64.69%。碱法提取辣椒渣中蛋白质时,所需碱液浓度高,有研究^[15,16]表明,在高碱条件下,会改变蛋白质的特性,生成赖丙氨酸等有毒物质,引起辣椒蛋白质营养物质的损失;并且采用高浓度的碱液提取时,酸法沉淀后粗蛋白质中会有大量的盐,不利于蛋白质后期的除盐纯化^[17]。综合考虑,超声辅助碱法提取的碱液浓度为 0.3 mol/L 最好。

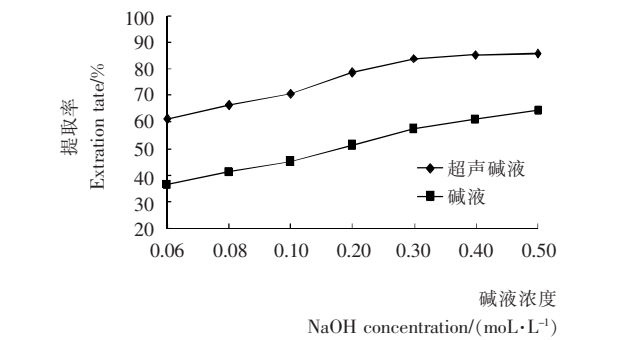


图 6 碱液浓度对辣椒蛋白质提取的影响
Figure 6 Effect of NaOH concentration on extraction rate of pepper protein

2.7 辣椒蛋白质超声碱法提取条件的正交优化

在单因素的基础上,设计以超声时间、超声温度、料液比、碱液浓度为四因素三水平的正交试验。正交试验设计见表 1,试验结果见表 2。

表 1 L ₉ (3 ⁴) 正交试验因素水平表				
Table 1 Factors and levels of orthogonal test				
水平	A 超声 时间/min	B 超声 温度/℃	C 料液比 (m : V)	D 碱液浓度/ (mol · L ⁻¹)
1	60	40	1 : 20	0.2
2	90	50	1 : 25	0.3
3	120	60	1 : 30	0.4

表 2 正交试验结果与分析					
Table 2 Results and analysis of orthogonal test					
试验号	A	B	C	D	提取率/%
1	1	1	1	1	64.21
2	1	2	2	2	75.74
3	1	3	3	3	78.06
4	2	1	2	3	67.84
5	2	2	3	1	73.98
6	2	3	1	2	78.61
7	3	1	3	2	77.03
8	3	2	1	3	84.48
9	3	3	2	1	85.53
k ₁	72.67	69.69	75.77	74.57	
k ₂	73.48	78.06	76.37	77.13	
k ₃	82.35	80.73	76.36	76.79	
R	9.68	11.04	0.60	2.55	

由表 2 可知,各因素对辣椒蛋白提取率的影响顺序为超声温度>超声时间>碱液浓度>料液比,最佳提取工艺为 A₃B₃C₂D₂,即超声温度 60 ℃,超声时间 120 min,碱液浓度 0.3 mol/L,料液比 1 : 25(m : V)。由正交试验分析,得出的最优工艺条件与单因素分析得出的最宜提取条件有所偏差,如超声时间,考虑到超声时间越长提取率越大,从提取率考虑,超声时间 120 min 更好。在正交最佳工艺下测得辣椒蛋白质的提取率为 86.48%。

采用正交最优工艺条件,进行重复性试验^[18]。结果见表 3。由表 3 可知,辣椒蛋白质平均提取率为 86.41%;相对平均偏差为 0.32%,相对标准偏差为 0.39%,且都小于 5%。由此表明在最佳正交条件下蛋白质提取率高,且试验重现性较好。

2.8 辣椒蛋白质等电点的测定

在正交最优条件下提取辣椒蛋白质,采用酸沉淀法和称重法测定辣椒蛋白的等点。蛋白质在某一 pH 的溶液中,它所带的正电荷与负电荷相等时,静电排斥作用最小,蛋白质沉淀,因此可选取沉淀最大的 pH 值作为蛋白质的等电点^[19]。由图 7 可知,在 pH 3.6 时,沉淀物最重,即 pH 3.6 为采用碱溶酸沉法提取时辣椒蛋白质的等电点。最后对辣椒粗蛋白进行纯度测定,测得蛋白质纯度为 60.09%。

表 3 重复性试验								
Table 3 Results of reduplicate tests								%
项目	试验 1	试验 2	试验 3	试验 4	试验 5	平均值	相对平均偏差	相对标准偏差
参数	86.48	86.17	85.96	86.76	86.66	86.41	0.32	0.39

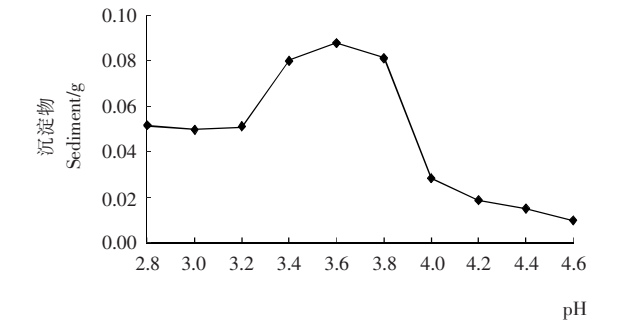


图 7 辣椒蛋白质溶解度与 pH 的关系

Figure 7 Effect of pH on solubility of pepper protein

3 结论

(1) 提取辣椒蛋白质, 超声辅助碱法比单一碱法提取效果好, 同等条件下, 大幅度提高了提取率。

(2) 用超声碱法提取蛋白质的最佳工艺条件是: 碱液浓度 0.3 mol/L, 料液比 1 : 25(*m* : *V*), 碱提温度 60 ℃, 超声提取时间 120 min。此条件下辣椒蛋白质的提取率达到 86.41%, 粗提取物中蛋白质质量分数为 60.09%, 并测得辣椒蛋白质的最佳等电点为 pH 3.6, 为辣椒渣蛋白质的提取及应用提供了理论依据。

参考文献

1 刘向前, 冯爱国, 李春艳. 辣椒营养成分开发利用研究进展[J]. 农业工程, 2013, 3(1): 48~51.

2 李军明. 辣椒的营养保健价值[J]. 中国食物与营养, 2010(2): 68~71.

3 赵国群, 张伟, 张桂. 辣椒粕发酵生产单细胞蛋白的菌种筛选研究[J]. 中国酿造, 2009, 28(7): 109~111.

4 杨清香, 葛亮, 潘锋, 等. 辣椒资源开发利用状况[J]. 农产品加工·学刊, 2010(10): 80~82.

(上接第 182 页)

进行食品加工选择超高压处理时, 应该全面地考虑不同的食品组分、贮藏环境等关键因素与不同 HPP 操作条件下的包装材料的相互影响规律才可以获得对 HPP 加工有现实指导意义的聚合物包装材料性能参数标准, 为评估产品的货架期提供可靠的依据。关于超高压处理后食品组分与包装材料的相互影响的研究还不够完善, 得到有效的标准来评估食品的质量安全及货架期的研究还需要进一步的试验。

参考文献

1 Matser A M. Advantages of high pressure sterilization on quality of food products[J]. Trends in Food Science and Technology, 2004, 15(4): 79~85.

2 Morris C, Brody A L, Wicker L, et al. Non-thermal food processing /preservation technologies: a review with packaging implications[J]. Packaging Technology and Science, 2007, 20(7): 275~286.

3 徐绍虎, 崔爽. 无菌包装食品冷杀菌技术研究进展[J]. 包装工程,

5 牛瑞, 秦胜利. 蛋白质分离纯化技术研究进展[J]. 化工科技市场, 2010, 33(4): 16~18.

6 黄礼勇, 焦利卫, 魏占姣. 一种用辣椒渣提取抗氧化物质的方法, 中国: 102127448A[P]. 2011—07—21.

7 高彦祥, 辛晓艳, 袁芳. 一种从辣椒渣中提取黄酮类化合物和总酚的方法, 中国: 102492007A[P]. 2012—06—13.

8 王岸娜, 刘小彦, 吴立根, 等. 蛋白质的提取、纯化及性质研究概述[J]. 中国食品工业, 2008(6): 56~58.

9 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB 5009.5—2010 食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.

10 陆晨. 茶渣中蛋白质的提取、脱色及改性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012.

11 黄国平. 玉米醇溶蛋白的超声波提取、改性与释药性能的研究[J]. 广州: 华南理工大学, 2004.

12 许英一, 江成英, 吴红艳. 超声波辅助碱法提取紫花苜蓿叶蛋白的工艺研究[J]. 食品工业, 2013, 34(8): 14~16.

13 潘晶, 张晖, 王立, 等. 棉籽蛋白两步法提取及其功能性质研究[J]. 中国油脂, 2010, 35(7): 19~23.

14 沈遂清, 黄光荣, 王向阳, 等. 茶渣中蛋白质的碱法提取工艺研究[J]. 中国食品学报, 2008, 7(6): 108~112.

15 Anshamillah, James A Hourigan, Colin F Chesterman. Application of carbohydrases in extracting protein from rice bran[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1997, 74(2): 141~146.

16 Shih F F, Daigle K. Use of enzymes for the separation of protein from rice flour[J]. Cereal Chemistry, 1997, 74(4): 437~441.

17 朱科学. 小麦胚蛋白质及其酶解产物的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2006.

18 杨国伟, 危晴, 刘卉, 等. 超声波辅助提取锁阳多糖的工艺研究[J]. 食品与机械, 2013, 29(3): 141~144.

19 张铁, 刘晓兰, 郑喜群. 利用碱提酸沉法从膨化玉米黄粉中提取谷蛋白[J]. 食品与机械, 2012, 28(2): 123~125.

2010(31): 113~116.

4 邱伟芬, 江汉湖. 食品超高压杀菌技术及其研究进展[J]. 食品科学, 2001(5): 81~83.

5 Perera N, Gamage T V, Wake ling L, et al. Color and texture of apples high pressure processed in pineapple juice[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2010, 11(1): 39~46.

6 Oey I, Vander Plancken I, Van Loey A, et al. Does high pressure processing influence nutritional aspects of plant based food systems[J]. Trends in Food Science and Technology, 2008, 19(6): 300~308.

7 张波波, 王丹, 马越, 等. 超高压和 UHT 对草莓汁中多酚氧化酶活性的影响[J]. 食品与机械, 2014, 30(1): 145~148.

8 段虎, 王祎娟, 马汉军. 超高压处理对肉和肉制品食用品质的影响[J]. 食品与机械, 2011, 27(1): 151~154.

9 宋丹丹, 马永昆, 宋万杰, 等. 超高压对胡萝卜—草莓复合汁中酶和微生物的影响[J]. 食品与机械, 2007, 23(6): 39~41.

10 Lambert Y, Demnneau G, Largeteau A, et al. Packaging for high-pressure in the foodindustry [J]. Package Science and Technology, 2003(13): 63~71.